



RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

MINISTÈRE DE L'INDUSTRIE

INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

SEP 1 1983

COPIE OFFICIELLE
 RECEIVED
 88 SEP -7 AM 8:38
 GROUP 180

LE DOCUMENT CI-ANNEXÉ EST LA COPIE CERTIFIÉE CONFORME,
 D'UNE DEMANDE DE TITRE DE PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
 ENREGISTRÉE A L'INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ
 INDUSTRIELLE.

PUBLIÉ

LE TITRE A ÉTÉ [REDACTED] LE...

19 Août 1983

ÉTABLIE A PARIS, LE... 23 MARS 1988.....

Pour le Chef de Service
 Directeur de l'Institut national
 de la propriété industrielle

A handwritten signature in dark ink, appearing to read 'Campenon'.

Y. CAMPENON

DEMANDE DE
(voir case cochée)☒ BREVET D'INVENTION☐ CERTIFICAT D'ADDITION☐ CERTIFICAT D'UTILITÉ☐ DEMANDE DIVISIONNAIRE☐ TRANSFORMATION D'UNE DEMANDE DE BREVET EUROPÉEN.

COUJE FISTAL OU LIEU DE DÉPÔT

75
DÉPÔT POSTAL 99

DUPLICATA DE LA REQUÊTE

RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIVISIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION
NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE

NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

CABINET PLASSERAUD
84, rue d'Amsterdam
75009 PARISDATE DE
REMISE
DES PIÈCES

16 FEV 1982

DATE DE
DÉPÔT

16/02/82

N° D'ENREGISTREMENT
NATIONAL

82 02526

RÉFÉRENCE DU DEMANDEUR
OU DU MANDATAIRE :

CHP/26.82.01

DATE DU POUVOIR GÉNÉRAL ET NUMÉRO
DE TÉLÉPHONE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE :

280 67.77

1) TITRE DE L'INVENTION

NOUVEAUX TETRASACCHARIDES ET LEUR PRÉPARATION

NOMBRE DE
REVENDEMENTS :

2) DEMANDEUR : NOM ET PRÉNOMS OU DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE :

2

N° SIRENE, LE CAS ÉCHÉANT

CHOAY S.A.
société anonyme

3) NATIONALITÉ :

française

4) ADRESSE COMPLÈTE :

48, avenue Théophile-Gautier
75782 PARIS CEDEX 16

PAYS

FRANCE

5) INVENTEUR

LE DEMANDEUR EST
L'INVENTEUR

NON

6) LE DEMANDEUR REQUIERT QUE
L'ÉTABLISSEMENT DE L'AVIS
DOCUMENTAIRE SOIT DIFFÉRE

OUI

LE DEMANDEUR REQUIERT LE
BÉNÉFICE DU PAIEMENT ÉCHELONNÉ
DE LA TAXE D'AVIS DOCUMENTAIRE

NON

LE DEMANDEUR BÉNÉFICIE
POUR L'INVENTION CONCERNÉE, D'UNE DÉCISION
DE RÉDUCTION DES TAUX DE TAXE

NON

7) DÉCLARATION DE PRIORITÉ
PAYS D'ORIGINE

DATE DE DÉPÔT

NUMÉRO



8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION :

NATURE DE LA DEMANDE PRINCIPALE :

ADDITIONS ANTERIEURES : 1° N°

2° N°

N°

3° N°

DATE DE DÉPÔT :

4° N°

SIGNATURE
DU DEMANDEUR
OU
DE SON
MANDATAIRE

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT
DE LA DEMANDE À L'IN.P.I.

<p>⑪ N° PUBLICATION 2 521 565</p> <p>⑫ N° REGISTREMENT NATIONAL 82 02526</p> <p>NATURE DU DOCUMENT A1 DEMANDE</p> <p>DE BREVET D'INVENTION</p> <p>⑬ DATE DE DÉPÔT 16 FEVRIER 1982</p> <p>⑭ BOPI DEMANDE N° 33 DU 19/08/83</p> <p>DATE DE DELIVRANCE</p> <p>⑮ BOPI DELIVRANCE N°</p> <p>⑯ CLASSIFICATION INTERNATIONALE CLASST 3</p> <p>0374 15/18 ;</p>	<p style="text-align: center;">INSTITUT NATIONAL DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE PAGE DE GARDE</p> <p>CODE POSTAL DU LIEU DE DÉPÔT 75 DÉPÔT POSTAL - 99</p> <p>RATTACHEMENT DE LA DEMANDE DIVISIONNAIRE OU DE LA TRANSFORMATION NATURE, N° ET DATE DE LA DEMANDE INITIALE:</p> <p>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</p> <p style="text-align: center;">CABINET PLASSERAUD 84, rue d'Amsterdam 75009 PARIS</p>
---	---

CERTIFICAT D'UTILITÉ 04/82

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL 82 02526

1) TITRE DE L'INVENTION (54)

NOUVEAUX TETRASACCHARIDES ET LEUR PREPARATION

2) DEMANDEUR : NOM ET PRÉNOMS OU DÉNOMINATION ET FORME JURIDIQUE: (71)

2

N° SIRENE, LE CAS ÉCHÉANT

CHOAY S.A.
société anonyme

française

4) ADRESSE COMPLÈTE:

48, avenue Théophile-Gautier
75782 PARIS CEDEX 16

PAYS
FRANCE

5) INVENTEUR (72)

LE DEMANDEUR EST L'INVENTEUR : NON

<p>7) DÉCLARATION DE PRIORITÉ (30)</p>	<p>DATE DE DÉPÔT (32)</p>	<p>NUMÉRO (33)</p>	<p style="text-align: right;">Nbre</p> <p>P. de G. (Req) 1 NON</p> <p>P. de G. (Pub) 9</p> <p>Des et Rev 9</p> <p>Avis Doc 3</p> <p>Pl. de Dessin 1</p> <p>D. Inventeurs 1</p>
--	---------------------------	--------------------	--

8) RATTACHEMENT DU CERTIFICAT D'ADDITION:

NATURE DE LA DEMANDE-PRINCIPALE :

ADDITIONS ANTERIEURES : 1° N° 2° N° 3° N°

<p>Abrégé</p> <p>TOTAL</p>	<p>DATE DE DÉPÔT: 16</p>
----------------------------	--------------------------

Demande de Certificat d'Utilité résultant de la transformation
de la Demande de Brevet déposée le 16.02.82
(Article 20 de la loi du 2 Janvier 1968 modifiée et articles 42 et 43
du Décret du 19 Septembre 1979)

DIVISION ADMINISTRATIVE DES BREVETS

DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)
CHP.MTB - 26-82-01

N° d'enregistrement national

820 2526.

Titre de l'invention :

NOUVEAUX TETRASACCHARIDES ET LEUR PREPARATION~~XXXXXXXXXX~~

La Demanderesse CHOAY s.a. représentée
par son mandataire le CABINET PLASSERAUD,
84, rue d'Amsterdam,
75009 - PARIS -

désigne (nt) en tant qu'inventeur (s) (nom, prénoms, adresse)

Jean CHOAY,
21, rue Saint Guillaume,
75007 - PARIS -

Jean-Claude JACQUINET,
1, allée André Gide,
45100 - ORLEANS - LA SOURCE -

Maurice PETITOU,
27, rue du Javelot,
Appt. 201,
75645 - PARIS CEDEX 13 -

Pierre SINAY,
5, rue Jacques Monod,
45100 - ORLEANS -



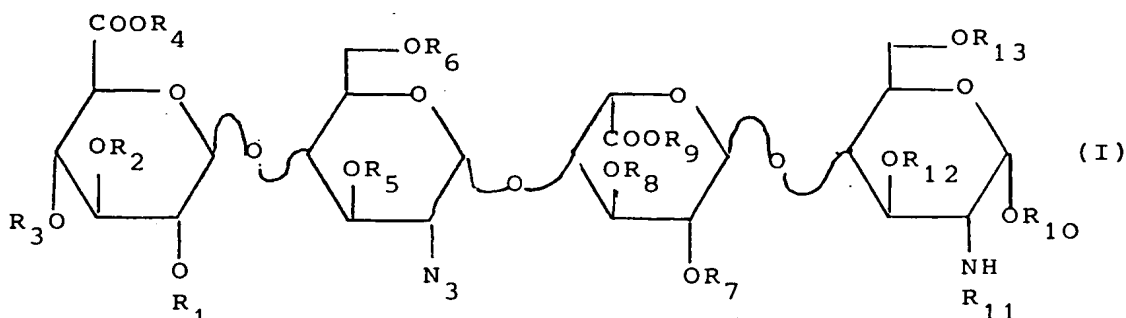
Date et
signature (s) du (des) demandeur (s) ou du mandataire

16.02.82

CABINET PLASSERAUD
pp

"Nouveaux tétrasaccharides et leur préparation"

L'invention a pour objet de nouveaux tétrasaccharides formés d'un enchaînement de motifs respectivement à structure [acide D-glucuronique]-[D-glucosamine]-[acide L-iduronique]-[D-glucosamine] de formule I :



dans laquelle

-R₁ à R₁₃ représentent des groupements protecteurs, le cas échéant différents, compatibles,

.R₁ à R₃, R₈, R₁₀ et R₁₂ représentant plus particulièrement un groupe benzyle,

.R₄ et R₉, un groupe alcoyle, en particulier renfermant 1 à 3 atomes de carbone, de préférence un groupe méthyle,

.R₅ à R₇ et R₁₃, un groupe acyle, en particulier un groupe acétyle, et

.R₁₁ un groupe benzyloxycarbonyle.

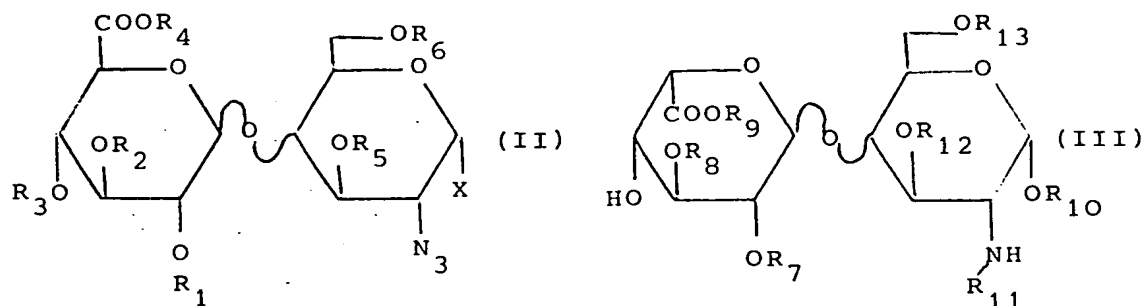
Des tétrasaccharides préférés répondent à la formule I ci-dessus dans laquelle R₁ à R₃, R₈, R₁₀ et R₁₂ représentent un groupe benzyle, R₄ et R₉, un groupe méthyle et R₅ à R₇ et R₁₃ un groupe acétyle.

L'invention vise également un procédé de préparation de ces tétrasaccharides.

Ce procédé comprend le couplage d'un disaccharide A à structure acide [D-glucuronique]-[D-glucosamine] avec un disaccharide B à structure [acide L-iduronique]-[D-glucosamine].

Ces disaccharides A et B répondent respectivement aux formules II et III suivantes





dans lesquelles les substituants R_1 à R_{13} présentent les significations données ci-dessus et X représente un groupe réactif en particulier un atome d'halogène de préférence du brome.

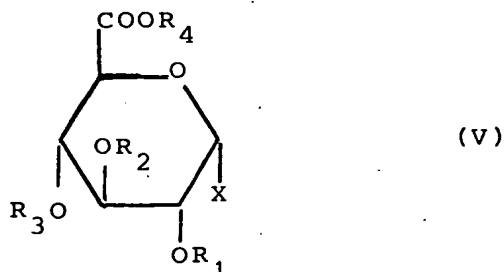
Pour préparer les tétrasaccharides préférés de l'invention, on met en oeuvre des disaccharides A et B de formule II et III dans lesquelles R_1 à R_3 , R_8 , R_{10} et R_{12} représentent un groupe benzyle, R_4 et R_9 , un groupe méthyle et R_5 à R_7 et R_{13} un groupe acétyle.

On observera que les disaccharides A et B mis en oeuvre sont des dérivés semi-ouverts, dans lesquels les différentes positions intervenant dans la réaction de glycosylation sont convenablement bloquées par des groupes protecteurs, le cas échéant différents, compatibles, ne réagissant pas dans les conditions de la réaction de glycosylation effectuée.

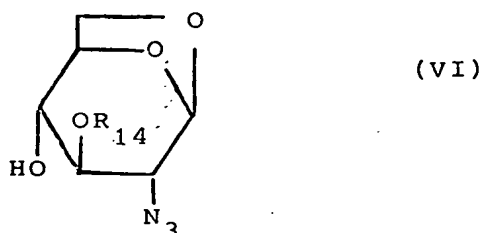
Ces disaccharides ne comportent alors chacun qu'un groupement réactif capable d'autoriser la réaction de glycosylation recherchée, ce groupement réactif se trouvant sur le carbone anomère en position 1 du motif glucosamine pour le dérivé A, et sur le carbone en position 4 du motif acide L-iduronique pour le dérivé B.

L'obtention d'un dérivé A comportant un tel groupe réactif est avantageusement réalisée par réaction d'un monosaccharide à structure acide D-glucuronique de formule V :





avec un monosaccharide à structure D-glucosamine de formule VI :



dans lesquels les substituants déjà évoqués présentent les significations données ci-dessus et R₁₄ représente un groupement protecteur permettant l'introduction aisée de R₅ et plus spécialement un groupe benzoyle.

On remarquera l'intérêt d'utiliser le monosaccharide de formule V dans lequel les groupes -OH en positions 1 et 6 sont bloqués sous forme anhydro, ce qui permet de disposer durant la synthèse du disaccharide A d'un motif constituant potentiellement un motif ayant une structure D-glucosamine mais n'interférant pas avec les réactions mises en jeu dans la synthèse. Selon un autre aspect, ce blocage par un groupe anhydro permet l'introduction sur les carbones en positions 1 et 6 des groupements préférés -OCOCH₃ par ouverture du pont anhydro et acétylation.

On dispose alors d'un disaccharide dans lequel les différents groupes -OH sont convenablement bloqués et le substituant sur le carbone anomère en position 1 peut être traité aux fins d'introduction du groupement réactif devant intervenir dans la réaction de glycosylation avec le dérivé B,

Pour la préparation de ce dérivé B, on a avantageusement recours au procédé de synthèse décrit dans la demande de brevet FR No 82 01575 déposée le 1er février 1982 au nom de la Demanderesse.



L'invention vise également, en tant qu'intermédiaires, les produits nouveaux mis en oeuvre au cours du procédé de l'invention.

Les composés de l'invention présentent
 5 notamment un grand intérêt en tant qu'intermédiaires en synthèse osidique, plus spécialement pour la synthèse d'oligosaccharides constitutifs de l'héparine ou de l'héparanesulfate.

Ils permettent ainsi d'obtenir par voie de
 10 synthèse des oligosaccharides à activité anti-Xa (Yin-Wessler) supérieure à celle de l'héparine et à activité USP pratiquement négligeable. Les tests Yin-Wessler et USP sont rappelés notamment dans la demande de brevet FR 78 31357 du 6 novembre 1978 au nom de la
 15 Demanderesse.

Les principales étapes et les produits intermédiaires obtenus, qui font donc également partie de l'invention sont illustrés dans les figures 1 et 2. Les formules chimiques des composés de départ, des composés intermédiaires successivement obtenus et des
 20 composés finaux, données dans ces figures portent des références numériques, également utilisées pour désigner les mêmes produits dans la description.

Les abréviations utilisées dans ces formules ont les significations suivantes : Ac : un groupe acétyl ; Me : méthyle ; Bn : benzyle ; Bz : benzoyl.

E X E M P L E

SYNTHESE DU DERIVE 4 :

Le produit 2 (1g), en solution dans du dichlorométhane (50 ml), est agité en présence de drierite (6g)
 30 et de carbonate d'argent fraîchement préparé (4,5g), pendant 1 heure sous une atmosphère d'argon. On ajoute alors l'halogénure 1 (2,8g) dissous dans du dichlorométhane (10 ml). Après 1 heure 1/2 on ajoute à nouveau
 35 2,8g d'halogénure 1. Après une nuit les solides sont



éliminés par filtration et le résidu obtenu après évaporation des solvants est purifié sur colonne de silice dans le solvant acétate d'éthyle/chloroforme (1/30 ; v/v).

5 On obtient ainsi le produit 4 (866 mg ; rendement 42 %). Il est cristallisé dans un mélange hexane/acétate d'éthyle.

P.F. : 104-106°C ; $[\alpha]_D^{20} = 0^\circ$ (c=1 ; chloroforme).

10 L'analyse élémentaire et le spectre RMN sont conformes à la structure recherchée.

SYNTHESE du DERIVE 6 :

15 Le dérivé 4, (1,5g) est dissous dans un mélange de chloroforme et de méthanol (1/1 ; v/v). On ajoute ensuite 2 ml de méthanolate de sodium (2M dans méthanol). Après 20 minutes, la solution est neutralisée par addition de résine Dowex 50 conduisant au dérivé 5 qui n'est pas isolé. Après filtration et évaporation, une méthylation classique par le diazométhane dans l'éther permet de réestérifier la fraction d'acide carboxylique éventuellement libéré. Après évaporation le résidu est traité par un mélange de pyridine (20 ml) et d'anhydride acétique (2ml) pendant une nuit. Après évaporation, le résidu est cristallisé dans de l'acétate d'éthyle/hexane donnant le produit 6 (1,125g ; rendement 81,6%).

20 P.F. : 103-105°C ; $[\alpha]_D^{20} = +5,2^\circ$ (c = 1 ; chloroforme).

25 L'analyse élémentaire et le spectre RMN sont conformes à la structure recherchée.

30 En variante, on prépare le dérivé 6 en opérant comme décrit ci-dessus mais en mettant en oeuvre le dérivé 3 au lieu du dérivé 2.

SYNTHESE du DERIVE 7 :

35 Le composé 6 (1g) est dissous dans l'anhydride acétique (10ml) puis refroidi à -20°C sous



argon. A la solution froide, on ajoute de l'acide sulfurique concentré (100 μ l). Après 30 minutes, le mélange réactionnel est dilué par du chloroforme (150 ml) puis versé sur une solution aqueuse de bicarbonate de sodium (26,5 g dans 400 ml). A la fin du dégagement gazeux la phase chloroformique est lavée deux fois avec une solution saturée de NaCl puis séchée et concentrée. Après chromatographie sur silice (50 g) dans un mélange d'acétate d'éthyle et de chloroforme 1/20 v/v, on obtient le composé 7 (995 mg ; rendement 86,7%).

Ce composé se présente sous forme d'une mousse blanche.

Le spectre et l'analyse élémentaire confirment l'obtention de la structure recherchée.

SYNTHESE du DERIVE 8 :

A du tétrabromure de titane (213 mg) on ajoute une solution du dérivé 7 (0,2g) dans du dichlorométhane/acétate d'éthyle (9/1 ; v/v 4 ml). Après une nuit sous agitation suivie d'une dilution par du dichlorométhane, on verse sur un mélange eau glace (50 ml), puis on lave avec deux fois 50 ml d'eau glacée. Après séchage et évaporation le sirop obtenu est chromatographié sur silice dans le solvant acétate d'éthyle/chloroforme 1/20 ; v/v. On obtient ainsi le dérivé 8 avec un rendement de 25 à 50%.

Spectre de RMN : (ppm, CDCl_3) : 2,04 ; 2,11 :

2 singulets de 3 protons 2-OAc ; 3,7 : 1

singulet de 3 protons COOMe ; 6,33 : 1 doublet de 1 proton H_1 ; $J_{1,2} = 3,5$ Hz.

SYNTHESE du DERIVE 10 :

Une solution de bromure 8 (50 mg, 60 μ M) et de l'alcool 9 (43 mg, 50 μ M) dans du dichlorométhane anhydre (1ml) est agitée à l'abri de la lumière sous atmosphère d'argon sec en présence de tamis moléculaire



4 Å (poudre, 100 mg) pendant 15 minutes. Après refroidissement à -10°C , de la sym-collidine (11 μl , 80 μM) et du trifluorométhanesulfonate d'argent (triflate d'Ag, 18 mg, 70 μM) sont ajoutés successivement, et l'agitation est maintenue dans ces conditions pendant 3 heures. Le mélange réactionnel est alors dilué avec du dichlorométhane (30 ml), les solides sont essorés, et le filtrat est lavé avec une solution 0,1 M d'acide chlorhydrique glacée, avec de l'eau, avec une solution aqueuse saturée d'hydrogénocarbonate de sodium, avec de l'eau, séché (sulfate de sodium), filtré et évaporé.

Le résidu est chromatographié sur une colonne de gel de silice (7 g). L'élution par le mélange hexane-acétate d'éthyle (4 : 3, v/v) donne 56 mg de tétrasaccharide 10 (rendement 70%) sous forme d'un verre incolore qu'il n'a pas été possible de cristalliser.

Caractéristiques du spectre RMN :

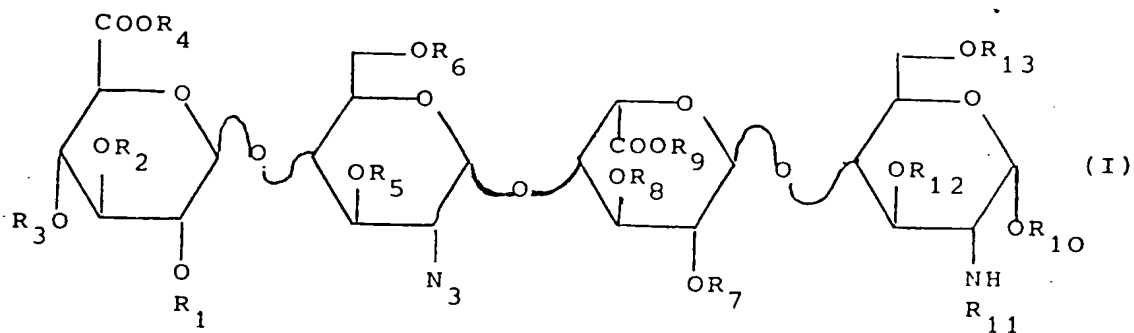
(270 MHz , CDCl_3) : S : 7,25 (m, 35 H, 7 Ph) ;
 5,35 (d.d.d., 1 H, H_3'' , J_2'' , J_3'' : H_2' , J_3'' , J_4'' 9 Hz) ;
 5,27 (d., 1 H, H_1'' , J_1'' , J_2'' : 3.5 Hz) ; 4.31 (d., 1 H, H_1'' , J_1'' , J_2'' : 7,5 Hz) ;
 3,68 (s, 3H, COOMe IDO) ; 3,59 (s, 3H, COOMe gluco) ;
 3,37 (d.de d., 1H, H_2'' , J_1'' , J_2'' : 7,5 Hz , J_2'' , J_3'' : 9.5 Hz)
 3,18 (d.de d., 1H, H_2'' , J_1'' , J_2'' : 3,5 Hz , J_2'' , J_3'' : 11 Hz) ;
 2,06 et 1,97 (2s, 9 H , 4 OAc).

Ce spectre est reporté sur la figure 3.



REVENDICATIONS

1. Tétrасaccharides, caractérisés en ce qu'ils sont formés d'un enchaînement de motifs à structure [acide D-glucuronique-D-glucosamine-acide L-iduronique-D-glucosamine], de formule I

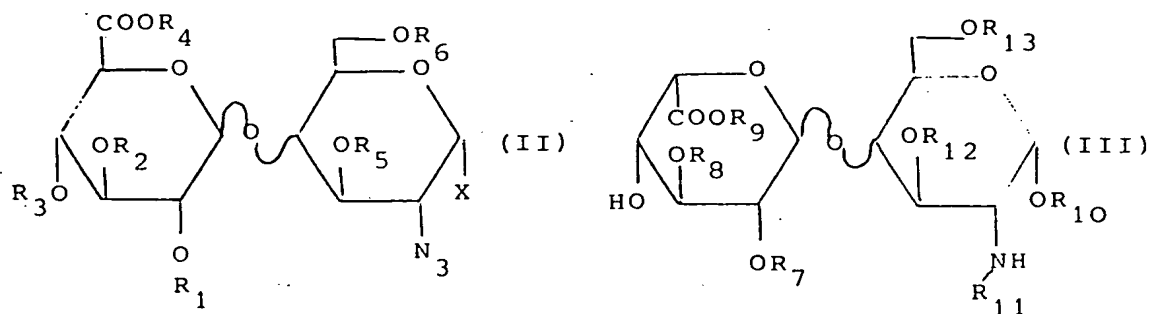


dans laquelle :

- R₁ à R₁₃ représentent des groupements protecteurs, le cas échéant, différents, compatibles,
- . R₁ à R₃, R₈, R₁₀ et R₁₂ représentent plus particulièrement un groupe benzyle.
- . R₄ et R₉, un groupe alcoyle, en particulier renfermant 1 à 3 atomes de carbone, de préférence un groupe méthyle.
- . R₅ à R₇ et R₁₃, un groupe acyle, en particulier un groupe acétyle, et
- . R₁₁ un groupe benzyloxycarbonyle.

2. Procédé de préparation de tétrasaccharides selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comporte la réaction du disaccharide A avec le disaccharide B, de formules II et III respectives :





dans lesquelles les substituants R_1 à R_{13} présentent les significations données ci-dessus et X représente un groupe réactif en particulier un atome d'halogène, de préférence du brome; dans des conditions permettant leur couplage.



FIGURE 1

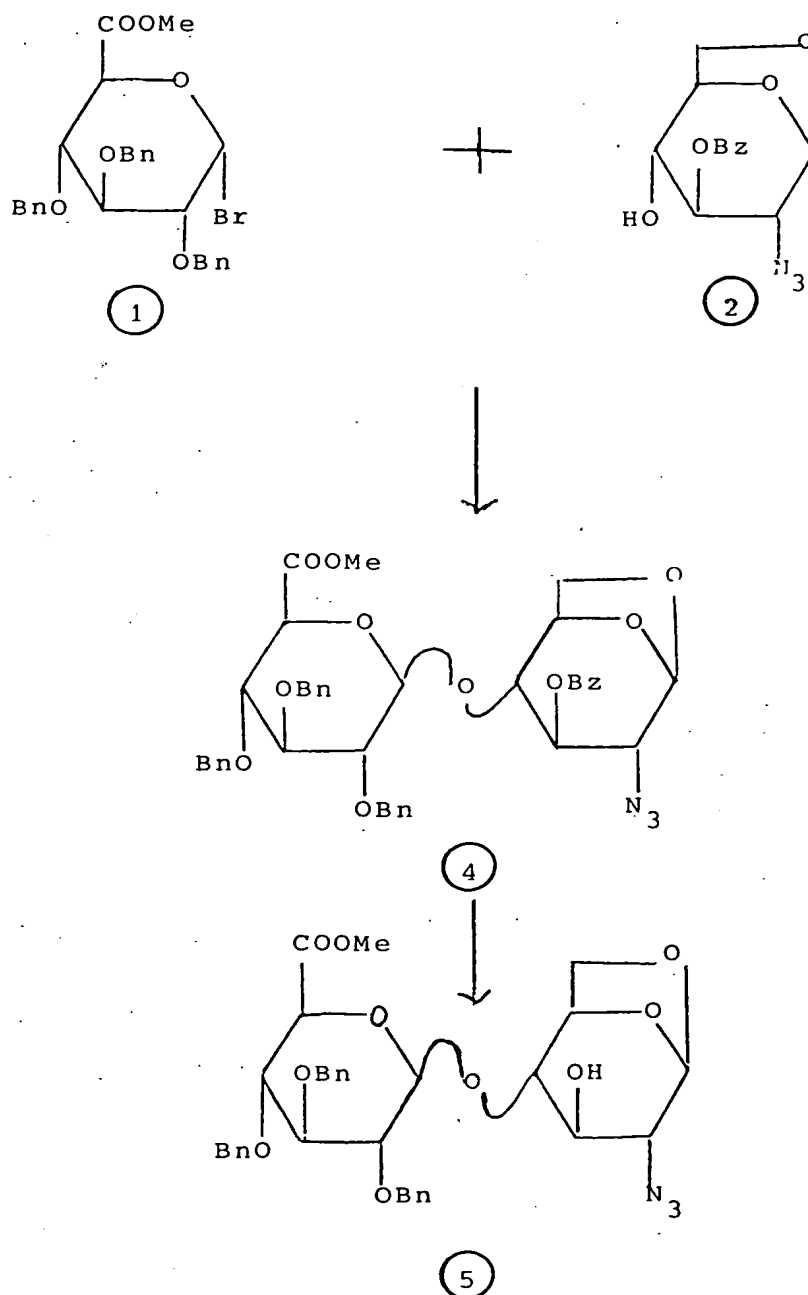
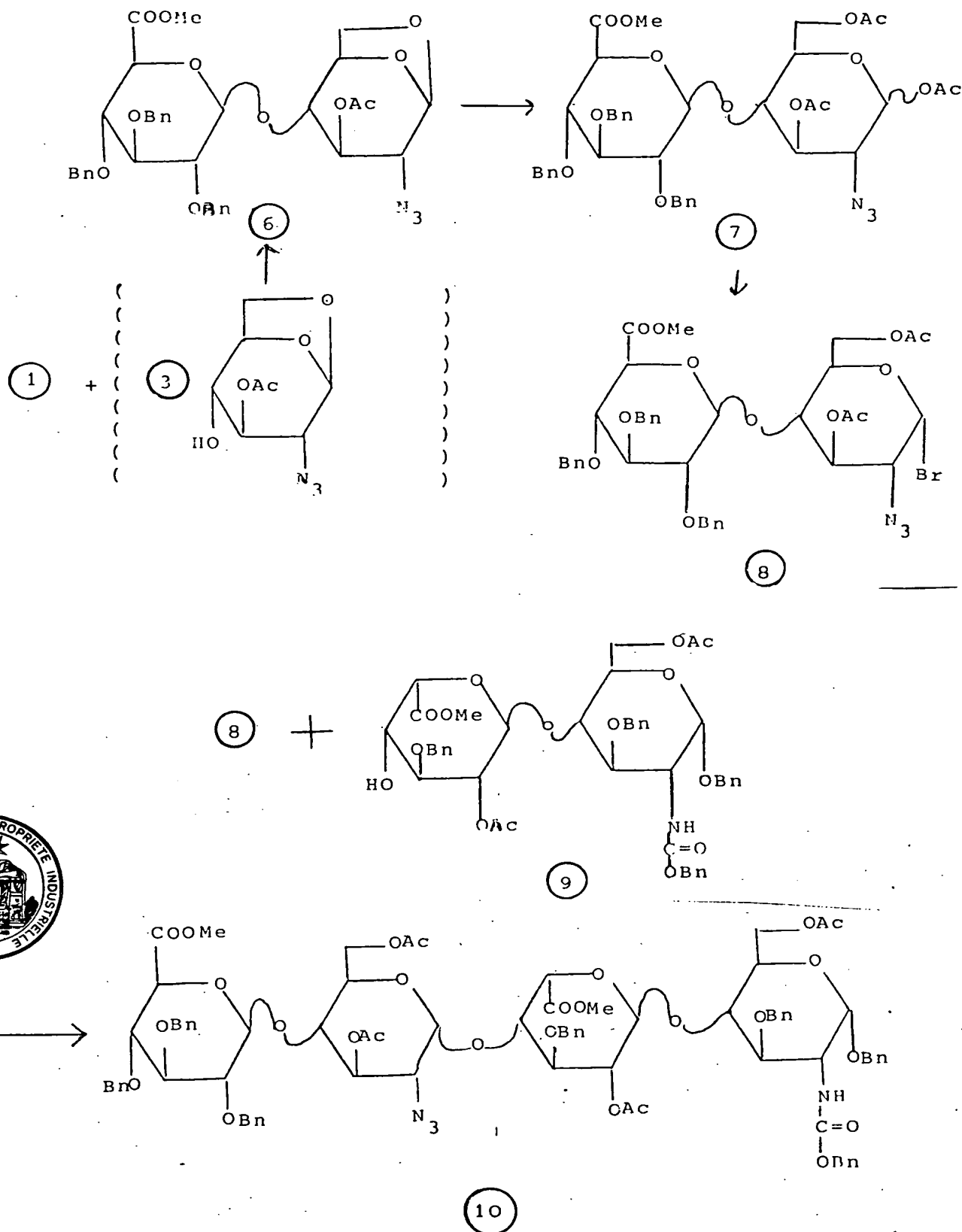


FIGURE 2





A-3 (H" ₃), A-1 (H" ₁) : unité α-D-glucosamine
 G-1 (H" ₁) : unité α-D-glucuronique
 G-2 (H" ₂) : unité acide glucuronique
 A-2 (H" ₂) : unité glucosamine

